

DE 197 26 255

File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200117
(c) 2001 DERWENT INFO LTD

?s pn=de 19726255
S4 1 PN=DE 19726255
?t s4/23/1

4/23/1
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 DERWENT INFO LTD. All rts. reserv.

012255507

WPI Acc No: 1999-061613/199906

XRAM Acc No: C99-018516

Use of proteolytic enzymes, especially trypsin, bromelain and/or papain -
to influence cytokine(s), e.g., in treatment of cancer or auto-immune
diseases

Patent Assignee: MUCOS PHARMA GMBH & CO (MUCO-N)

Number of Countries: 020 Number of Patents: 004

Abstract (Basic): DE 19726255 A

Use of at least one proteolytic enzyme, and optionally rutoside,
for influencing cytokines, is new. (N.B. rutoside is a glycoside
compound of the flavonoid class).

USE - The proteolytic enzymes may act by modulating the binding
capability of cell surface molecules of the immune system. The process
may be useful in treatment of cancer, autoimmune disorders or AIDS.

ADVANTAGE - No damaging side effects are observed, even with use of
the enzymes (or combination of enzymes) over a long period of time.

Dwg.0/5

Title Terms: PROTEOLYTIC; ENZYME; TRYPSIN; BROMELAIN; PAPAIN; INFLUENCE;
CYTOKINE; TREAT; CANCER; AUTO; IMMUNE; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/48

International Patent Class (Additional): A61K-031/70; A61K-031-35;

A61K-038/19; A61K-038/54; A61K-038-48; A61K-038/48



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 26 255 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
A 61 K 38/48
A 61 K 31/70
A 61 K 38/19

②1 Aktenzeichen: 197 26 255.4
②2 Anmeldetag: 20. 6. 97
④3 Offenlegungstag: 24. 12. 98

DE 197 26 255 A 1

⑦1 Anmelder: Mucos Pharma GmbH & Co, 82538 Geretsried, DE	⑦2 Erfinder: Ransberger, Karl, 82402 Seeshaupt, DE; Stauder, Gerhard, Dr., 82538 Geretsried, DE
⑦4 Vertreter: Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, Anwaltssozietät, 80538 München	⑤6 Entgegenhaltungen: DE 43 02 060 A1 DE 41 30 221 A1 WO 97 24 138 A2 WO 96 00 082 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Beeinflussung von Cytokinen durch proteolytische Enzyme

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym zur Beeinflussung von Cytokinen. Bevorzugte proteolytische Enzyme sind Trypsin, Bromelain und Papain. Außerdem kann Rutosid verwendet werden.

DE 197 26 255 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung von Cytokinen durch proteolytische Enzyme sowie die Verwendung proteolytischer Enzyme zur Beeinflussung von Cytokinen.

Wichtige Stoffwechselstoffe bei der Auslösung diverser Krankheitszustände sind die Cytokine. Cytokine sind kleine Proteine mit Molekulargewichten von 8000 bis 30000, wobei jedes Cytokin eine eigene Aminosäuresequenz und Zelloberflächenrezeptoren aufweist. Sie werden von einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen hergestellt und wirken auf fast jedes Gewebe und Organsystem. Die Namen, die den verschiedenen Cytokinen gegeben wurden, folgen keinem logischen System, sondern entsprechen vielmehr ihrer biologischen Eigenschaft. IL-1 und TNF (Tumornekrosefaktor) sind die primären proinflammatorischen Cytokine, und außerdem wirken diese zwei Cytokine in einer synergistischen Weise bei der Induktion von Entzündungen, Schock und Tod.

In den letzten 20 Jahren wurden auf Leukozyten des menschlichen Blutes mehr als 100 verschiedene Oberflächenmoleküle beschrieben. Ihre Identifikation, Charakterisierung und Funktionsbeschreibung wurde insbesondere durch die Technik der Herstellung von monoklonalen Antikörpern beschleunigt. Definierte Oberflächenmoleküle werden im allgemeinen in einer sog. CD-Nomenklatur ("cluster of differentiation") erfaßt.

Für einen Teil der Oberflächenmoleküle ist ihre Funktion bzw. ihr physiologischer Ligand bekannt. Für den Interleukin-2-Rezeptor (CD2S) z. B. ist das Interleukin-2 der natürliche Ligand. Auch andere Cytokine sind Liganden der Oberflächenmoleküle und werden daher von diesen beeinflusst.

Für verschiedene Oberflächenmoleküle von Leukozyten und Endothelzellen ist weiterhin beschrieben, daß sie durch Immunmediatoren in ihrer Antigendichte reguliert werden. So wird durch γ -Interferon die Expressionsdichte des Entzündungsmarkers HLA-DR auf Monozyten sowie des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1) auf Endothelzellen gesteigert.

Bei bestimmten Infektionen oder Krebserkrankungen kommt es zu einer Verschiebung von in Homöostase befindlichen verschiedenen Subpopulationen von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Normalerweise ist der Organismus in der Lage, im Prozeß einer Genesung die Verteilungsgleichgewichte der Subpopulationen wieder herzustellen.

Bei chronischen Erkrankungen, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen und der damit verbundenen permanenten Belastung des Immunsystems (z. B. durch Immunkomplexe und im Zusammenhang mit chronisch persistierenden Virusinfektionen wie AIDS), kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer vom Organismus nicht mehr kompensierbaren Verschiebung sowohl der Gleichgewichte der Zellpopulationen als auch der Expressionsdichte einiger spezifischer Antigene. Allgemein spricht man hier von einer unkontrollierten Aktivierung des Immunsystems.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand erhärtet sich die Annahme, daß die Modulation von Zelloberflächenmolekülen des Immunsystems ein besonderes Feld der "Medikation" darstellen könnte.

Der vorliegenden Erfindung lag daher daß technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Beeinflussung von Cytokinen anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch die in Anspruch 1 angegebene Erfindung gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Gemäß Anspruch 1 ist die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutosid zur Beeinflussung von Cytokinen vorgesehen.

Die durch das bzw. die proteolytischen Enzyme modulierten Immunglobuline zeichnen sich dadurch aus, daß deren Bindungsfähigkeit für die Komplementkomponente C1q erniedrigt ist. Dies gilt für natürliche C1q-bindende Immunglobuline (Subklassen IgG1, IgG2, IgG3, IgM und teilweise IgA).

Die geänderte C1q-Bindungsfähigkeit wird – ohne an eine Theorie gebunden zu sein – vermutlich durch eine Konformationsänderung der C_H2 -Domäne aufgrund der Enzymeinwirkung verursacht. Dabei kann die Konformationsänderung entweder durch eine enzymatisch verursachte Änderung unmittelbar in der C_H2 -Domäne hervorgerufen werden, oder die proteolytischen Enzyme bewirken eine Strukturänderung in den der C_H2 -Domäne benachbarten Bereichen, und dies Änderungen beeinflussen die Konformation der C_H2 -Domäne.

Die Behandlung von Neutrophilen mit proteolytischen Enzymen reduzierte deutlich die Expression z. B. des Rezeptors III für den Fc-Bereich von IgG und beeinflusst offenbar auch die Anzahl von Fc γ -R-II auf der Zelloberfläche. Es wird dabei die Bindung von IgG bedeckten Erythrozyten an Neutrophile verstärkt; ferner wird auch ihre Fähigkeit, IgG-vermittelte Funktionen, wie z. B. die antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität und Chemolumineszenz, die durch IgE induziert werden, verstärkt. Diese Reaktionen sind komplett abhängig von Fc γ -R-II.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain, Papain und gegebenenfalls Rutin verwendet oder eine Kombination derselben.

Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme lassen sich kostengünstig aus den folgenden Rohmaterialien isolieren.

Bromelain ist ein proteolytisch wirksames Enzym aus dem Preßsaft der Ananas und kann auch noch aus reifen Früchten isoliert werden.

Papain ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Milchsafte der unreifen, fleischigen Früchte des Melonenbaums *Carica Papaya* gewonnen wird. Reines Papain ist ein kristallines Polypeptid mit einem MG. von 23350, das aus einer Kette von 212 Aminosäureresten mit 4 Disulfid-Brücken besteht; Sequenz und Raumstruktur sind bekannt. Papain wird vielfältig eingesetzt: Aufgrund seiner Protein-spaltenden Eigenschaft als "Fleischzartmacher" oder "Mürbesalz", zum Klären von Bier, zur Brot- und Hartkeksherstellung, in der Lederzubereitung, in der Textil-Industrie zum Entbasten von Seide und zur Verhinderung von Wollverfilzung, in der Tabak-Industrie zur Qualitätsverbesserung, zur Rückgewinnung von Silber aus verbrauchtem photographischem Material, ferner in der Bakteriologie zur Pepton-Gewinnung. In der Medizin dient Papain bereits zur Unterstützung der enzymatischen Verdauung, zur enzymatischen Wundreinigung und als Zusatz zu Zahnprothese-Reinigungsmitteln. Für Spezialzwecke werden Papain-präparate auch an Kunststoffpolymere oder Agarose trägergebunden angeboten. Papain ist auch als Katalysator zur Synthese von Oligopeptiden verwendet worden.

Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das ebenfalls im Pankreas gebildet wird und in Verbindung mit anderen Enzymen bereits therapeutisch eingesetzt wird. Es gehört zu den Serin-Proteinasen. Kristallines Trypsin hat ein MG von ca.

23300, ist in Wasser, nicht aber in Alkohol löslich, besitzt ein Wirkungsoptimum bei pH 7–9 und spaltet peptid-Ketten spezifisch Carboxy-seitig der basischen Aminosäurereste L-Lysin und L-Arginin. Die räumliche Struktur des aus 223 Aminosäuren bestehenden Trypsins ist bekannt.

Eine besonders gute Wirksamkeit zeigt sich bei der Verwendung einer Kombination der Enzyme Bromelain, Papain und/oder Trypsin. Neben der bemerkenswerten und unerwarteten Wirkung dieser Enzyme hat die kombinierte Verwendung der genannten Enzyme weiterhin den Vorteil, daß auch bei einer Langzeitanwendung keine schädigenden Nebenwirkungen auftreten.

Weiterhin kann zusätzlich Rutosid dem Medikament beigemischt werden. Rutosid ist ein Glycosid, das zu den Flavonoiden gehört.

Eine besonders gute Wirksamkeit hat die kombinierte Verwendung von 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Dosisseinheit.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Kombination von 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid \times 3H₂O. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine Kombination von 48 mg Trypsin, 90 mg Bromelain und 100 mg Rutosid \times 3H₂O verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden 10 bis 100 mg, besonders bevorzugt 100 mg Rutosid \times 3 H₂O pro Dosisseinheit verwendet.

Das Medikament kann weiterhin alle üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

Als Hilfs- und Trägerstoffe kommen z. B. Lactose, Magnesiumstearat, Stearinsäure, Talkum, Methacrylsäure, Copolymerisat Typ A, Shellack, Makrogol 6000, Dibutylphthalat, Vanillin, Titandioxid, weißer Ton, Polyindon, gelbes Wachs und Carnaubawachs in Frage.

Die Erfindung betrifft ferner die zusätzliche Verwendung von α_2 -Makroglobulin (α_2 -M). α_2 -M ist einer der wichtigsten Inhibitoren von Proteinasen. α_2 -M reagiert mit einer Vielzahl von Endopeptidasen. Die Reaktion von α_2 -M mit der jeweiligen Proteinase läuft in der Regel so ab, daß α_2 -M einer Konformationsänderung unterliegt, nachdem es in Kontakt mit der Proteinase gekommen ist und diese daraufhin im Molekül festhält. Die Enzyminhibition beruht auf einer sterischen Behinderung, obwohl das aktive Zentrum des Enzyms seine Funktion behält. Durch die Beeinflussung der Proteinase trägt α_2 -M zu einer Immunmodulation durch Beeinflussung von Cytokinen bei.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Beeinflussung von Cytokinen, wobei die Cytokine mit einem oder mehreren proteolytischen Enzymen und gegebenenfalls Rutosid in Kontakt gebracht werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung im einzelnen erläutern.

Beispiel 1

Material und Methoden

1. Material

Es wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen verwendet: NaHCO₃ (Biochrom, 2 g/l); L-Glutamin (Biochrom, 2 mM), Na-Pyruvat (Biochrom, 1 mM), NaN₃ (Sigma, 0.01%).

Im Falle einer Stimulation der Zellen wurde entweder Phythämagglutinin M (Biochrom, 5 µg/ml) oder γ -Interferon (100 U/ml) eingesetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte dabei über 1–3 Tage mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Biochrom).

Als Targets für die zu untersuchenden Enzyme wurden frisch isolierte, humane, periphere, mononukleäre Blutzellen (Citratblut) verwendet. Nach der üblichen Isolation mittels Ficoll wurden die Zellen mehrfach gewaschen und frisch bei den Experimenten eingesetzt. Neutrophile Granulozyten wurden ebenfalls aus frischem Citratblut isoliert. Hierbei erfolgte die Abtrennung von den Lymphozyten/Monozyten mittels eines 2-Stufen-Ficoll-Gradienten.

2. Verwendete monoklonale Antikörper

Für die spezifische Erkennung der Oberflächenstrukturen der Leukozyten wurden monoklonale Antikörper verwendet. Diese erkennen auf den entsprechenden Antigenen jeweils ein definiertes Epitop, welches bei den von uns untersuchten Antigenen nur ein einziges Mal in der Struktur vorkommt. In Übersicht 1 sind die untersuchten Oberflächenmarker, die monoklonalen Antikörper sowie die analysierten Targetzellen dargestellt.

Übersicht I

Analysierte Oberflächenmarker, verwendete monoklonale Antikörper und Targetzellen der Enzymbehandlung

Marker	Epitop AK-Bez.	Fluorochrom	Produzent	Target-Zelle
CD2	Leu5b	PE ¹	B.D. ³	T-Lymphozyten
CD4	Leu3a	PE	B.D.	T-Lymphozyten
	OKT4	FITC ²	Ortho ⁴	T-Lymphozyten
CD25	IL-2R	PE	B.D.	PHA-Blasten

¹ Phycoerythrin, rote Fluoreszenz;² Fluoreszeinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz;³ Becton Dickinson, Heidelberg;⁴ Ortho Diagnostics

3. Inkubationsbedingungen

Die frisch isolierten und aufbereiteten Zellen wurden mit den Enzymen Bromelain, Papain und Trypsin (Arzneimittel-Inhaltsstoffe der Fa. Mucos) mit den jeweils in den Legenden der Tabellen und Abbildungen angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei der Mischung der drei Enzyme entsprach das Mischungsverhältnis 22,7 15,5 : 11,9 (Bromelain : Papain : Trypsin, bezogen auf 40 µg/ml, "BPT"). Es wurden drei Enzymkonzentrationen (40, 10, 2,5 µg/ml) untersucht. Die Inkubation fand in serumfreiem Medium bei 37°C statt.

Die Proteasen wurden unmittelbar vor den Inkubationen angesetzt. In den Zellkulturmedien war 0,01% Natriumacid enthalten. Durch diesen Zusatz werden die Zellen daran gehindert, während des Inkubationsprozesses oder der Waschvorgänge Rezeptormoleküle erneut zu exprimieren. Nach dem Auswaschen des Zellkulturmediums sind die Zellen wieder aktivierbar (nicht demonstriert).

Nach entsprechender Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Enzymen, Auswaschen der Enzyme und der Markierung mit monoklonalen Antikörpern (nach Angaben der Hersteller) wurde sofort die Analyse der Oberflächenmarker vorgenommen.

4. Analytische Durchflußcytometrie

Alle Untersuchungen zur Modulation von Zelloberflächenmolekülen wurden mittels analytischer Durchflußcytometrie (FACSCAN, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung einer gerätespezifischen Software (Lysis I) durchgeführt. Bei entsprechender Einstellung des Gerätes sowie der Mitführung von Referenzen, d. h. Zellen, die ohne Enzyme aber in derselben Prozedur behandelt wurden, erfolgte die Messung.

Für jede Subklasse der monoklonalen Antikörper wurde eine entsprechende fluoreszenzkonjugierte Isotypenkontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um Maus-Immunglobulin, mit welchem die Kapazität der unspezifischen Bindung der Targetzellen flußcytometrisch erfaßt wird.

Pro Histogramm wurden 10 000 Zellen gemessen. Die jeweilige Zellpopulation wurde mit einem sogenannten "elektronischen Gate" separiert, in dem sich dann mindestens 3 500 Zellen befanden.

5. Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte unabhängig vom Meßvorgang auf dem Durchflußcytometer mittels einer gerätespezifischen Software. Dabei wurden jeweils die Histogramme der Kontrollen, d. h. der unbehandelten Zellproben, mit den Histogrammen der enzymbehandelten Zellen verglichen.

Die Rohdarstellung umfaßt ein optisch eindrucksvolles, aber relativ unübersichtliches Histogramm, bei dem verschiedene Einzelmessungen übereinander gelagert abgebildet sind. Hier läßt sich insbesondere die Wirkung der Enzyme im Vergleich zur Referenz optisch transparent machen. Für diese Untersuchungen ist nicht der prozentuale Anteil einer Subpopulation an der gesamten Leukozytenpopulation die Meßgröße, sondern die relative Rezeptordichte, die sich als Fluoreszenzintensität darstellt.

Aus diesen Histogrammen, die beispielhaft sind und illustrativen Charakter haben, lassen sich Daten ableiten, welche die relative Fluoreszenzintensität der Einzelmessung reflektieren. Diese ist ein Maß für die relative Rezeptor- oder Oberflächenmoleküldichte bei einer gemessenen Zellpopulation.

Die Säulengraphiken zeigen in logarithmischer Darstellung den Medien der relativen Fluoreszenz. Es läßt sich so gegenüber der Referenz die Reduktion der Dichte des jeweiligen Oberflächenmoleküls in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration darstellen.

In den Tabellen sind die Daten unabhängiger Experimente enthalten. Die Nummern der Spender haben nur für die jeweilige Tabelle Gültigkeit und sind nicht auf andere Tabellen übertragbar. Wird in der Tabelle beispielsweise ein Wert von 40% angegeben, so bedeutet das, daß bei diesem Antigen 40% aller Oberflächenmoleküle durch das Enzym so ver-

ändert ist, daß der spezifische monoklonale Antikörper sein Epitop nicht mehr erkennt. Wird keine Reduktion beobachtet, so erscheint in den Tabellen der Wert "0". Die angegebene Prozentzahl drückt somit die Enzymleistung gegenüber den einzelnen Antigenen aus. Werte bis zu 20% werden im Einzelfall als nicht relevant angesehen.

Für eine Bewertung der Wirkung der Enzyme auf die einzelnen Antigene ist es günstig, einen geeigneten Vergleichsmaßstab zu wählen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle Untersuchungen unter standardisierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Damit kann für diese experimentellen Bedingungen die aus früheren Forschungsberichten bekannte Halbeffektkonzentration angegeben werden.

Zur Berechnung der Halbeffektkonzentration wurden die Daten mittels nicht-linearer Regression ausgewertet. Der Median der Fluoreszenzintensität versus eingesetzter Enzymkonzentration und Referenz werden zueinander in Beziehung gesetzt, und daraus läßt sich die Menge an Enzym berechnen, die zu einer 50%igen Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der in der Struktur veränderten Rezeptordichte führt.

Abb. 1

CD2-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD2 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 (vgl. Tab. 1) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abb. 2

CD4 (Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 2 (vgl. Tab. 2) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abb. 3

CD4 (Epitope OKT4 und Leu3a)-Modulation durch Trypsin; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von einem Spender (vgl. Tab. 3) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abb. 4

CD25-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: PHA-Blasten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD25 spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abb. 5

Reduktion der Leu3a-Antigendichte durch Trypsin. Frisch isolierte humane periphere, mononukleäre Blutzellen wurden mit Trypsin im serumfreien Medium inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem monoklonalen Antikörper anti-Leu3a markiert. Die Reduktion der relativen Fluoreszenzdichte von CD4 der Lymphozytenpopulation ist das Maß der Enzymaktivität. Die Halbeffektkonzentration von Trypsin gegenüber dem Epitop Leu3a von CD4 wird über die gefittete Kurve berechnet.

Ergebnisse

Tabelle 1

CD2-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von drei Experimenten mit Zellen von drei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
5 Bromelain	1	11,1	17,9	17,4
	2	6,1	12,2	14,3
	3	0	0	0
10 Papain	1	22,4	21,4	34,7
	2	5,4	9,5	17,0
	3	0	0	0
15 Trypsin	1	75,7	73,6	73,0
	2	83,7	21,1	0,7
	3	96,3	85,4	50,9
20 BPT	1	71,9	54,7	38,2
	2	74,1	8,8	18,4
	3	94,8	72,6	25,2
25				

Tabelle 2

30 CD4(Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
35 Bromelain	1	24,6	0	0
	2	16,2	0	0
40 Papain	1	2,5	3,2	0
	2	0	0	5,7
45 Trypsin	1	99,3	93,0	64,1
	2	99,4	96,2	57,5
50 BPT	1	98,3	49,3	23,0
	2	99,4	79,2	20,2
55				

Tabelle 3

60 Modulation der CD4-Epitope Leu3a und OKT4 durch Trypsin; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Daten von einem Spender dargestellt.

65

Enzym	Epitop	40 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
Trypsin	Leu3a	98,5	96,7	87,1
	OKT4	6,5	6,3	19,5
	Epitop	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
Trypsin	Leu3a	65,2	41,9	28,8
	OKT4	13,3	10,8	9,3

Tabelle 4

CD25-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt. Vor dem Experiment wurden die Zellen 3 Tage mitogenstimuliert.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	90,7	80,1	59,7
	2	62,6	43,6	0
Papain	1	92,2	81,0	60,7
	2	62,6	43,6	0
Trypsin	1	91,2	88,2	71,0
	2	78,9	73,9	52,8
BPT	1	92,1	89,7	50,9
	2	79,4	44,1	12,2

Tabelle 5

Berechnete Halbeffektkonzentration (µg/ml) von Bromelain, Papain, Trypsin und deren Kombination für die 50%ige Reduktion der Dichte von zellulären Oberflächenmolekülen. Die Enzyminkubation betrug 1 Stunde.

Enzyme	CD2	CD4 ³	CD25 ⁴
Bromelain Halbeffektkonz. ¹	n w	n w	18,4
Bereich ²	-	-	14-23
Papain Halbeffektkonz. ¹	n w	n w	12,4
Bereich ²	-	-	11-14
Trypsin Halbeffektkonz. ¹	1,5	2,5	< 2,5
Bereich ²	1-2	2,3-3,1	
B-P-T ⁵ Halbeffektkonz. ¹	9,3	16,4	16,0
Bereich ²	7,5-14	15,5-18	13-19

¹ berechnet aus Mittelwerten von 2 oder 3 unabhängigen Experimenten

² minimaler und maximaler Wert, % Konfidenzbereich = 1 δ , geschätzt

³ Modulation von CD4-Epitop Leu3a

⁴ auf stimulierten Zellen präsent

⁵ Mischung der Proteasen im Verhältnis 22,7 : 15,5 : 11,9
- Bromelain : Papain : Trypsin

n w: nicht wirksam im untersuchten System (max. 40 μ g Enzym/ml, 1 h Inkubation)

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutosid zur Beeinflussung von Cytokinen.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain oder Papain oder eine Kombination von einem oder mehreren dieser Enzyme verwendet wird.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Rutosid verwendet wird.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Dosiseinheit verwendet werden.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid \times 3 H₂O pro Dosiseinheit verwendet werden.
6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 48 mg Trypsin und 100 mg Rutosid \times 3 H₂O pro Dosiseinheit verwendet werden.
7. Verwendung gemäß einem oder mehreren der vorstehend genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich α_2 -Makroglobulin verwendet wird.
8. Verfahren zur Beeinflussung von Cytokinen, wobei die Cytokine mit einem oder mehreren proteolytischen Enzymen und gegebenenfalls Rutosid in Kontakt gebracht werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Abbildung 1

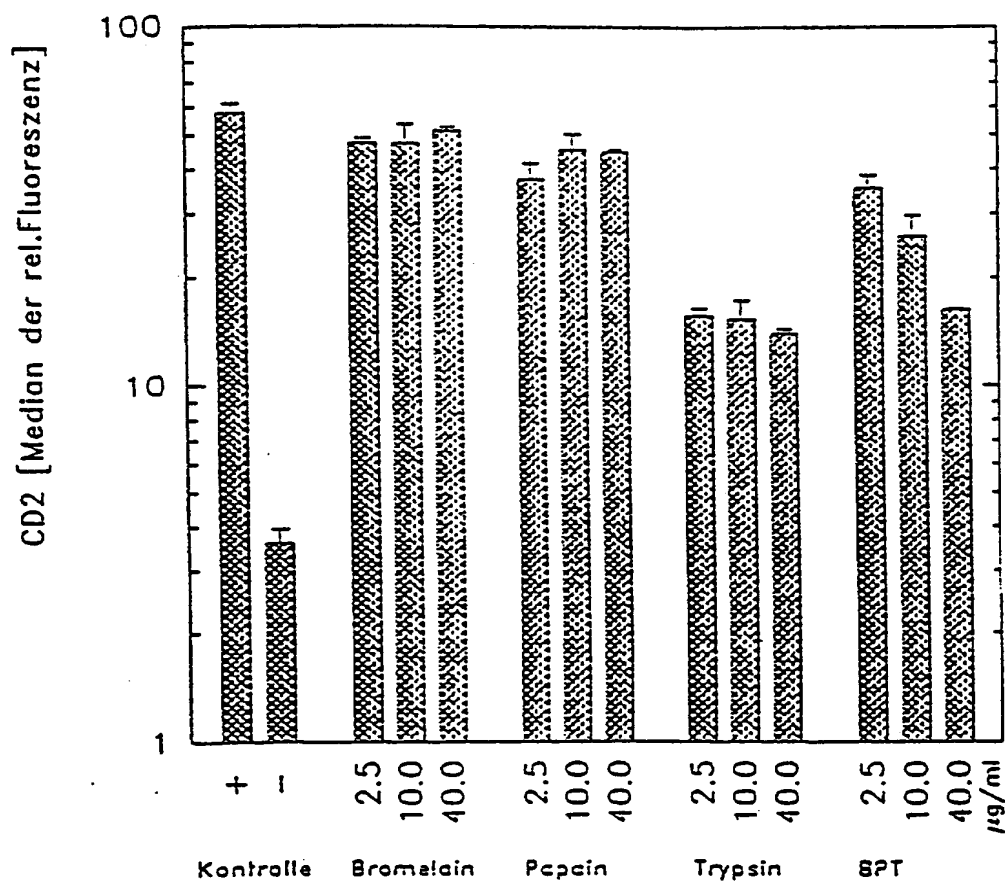


Abbildung 2

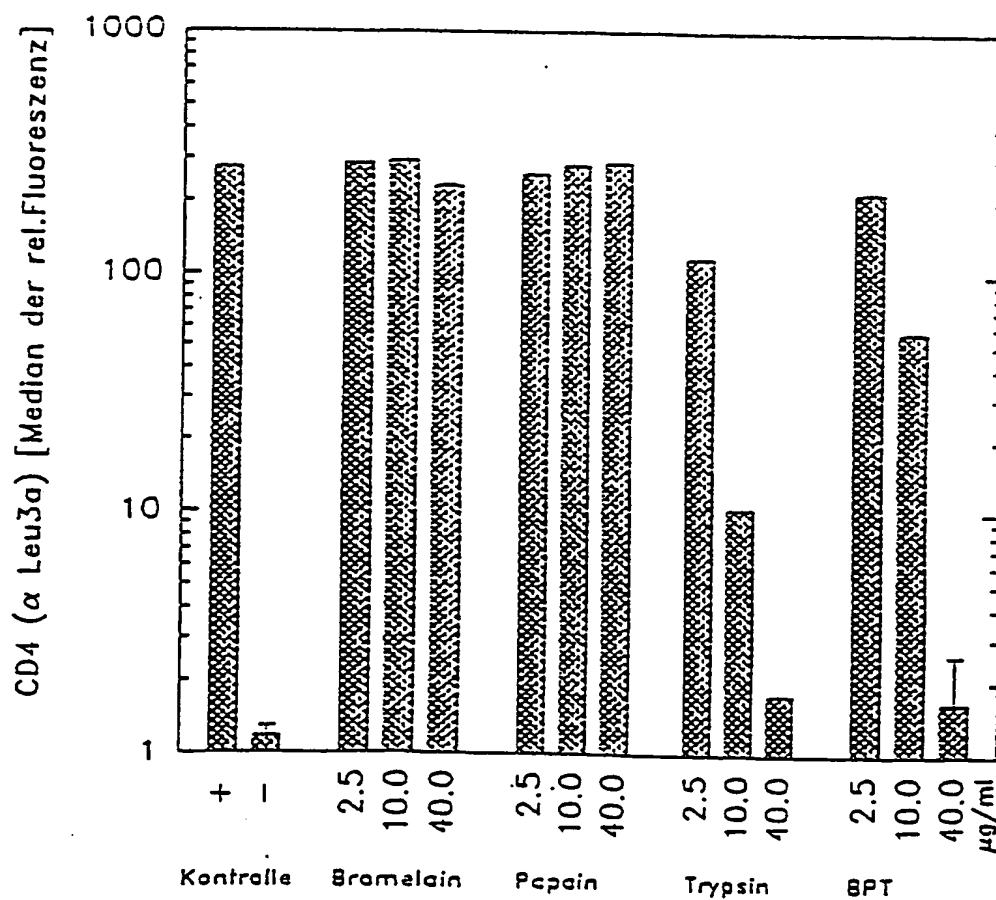


Abbildung 3

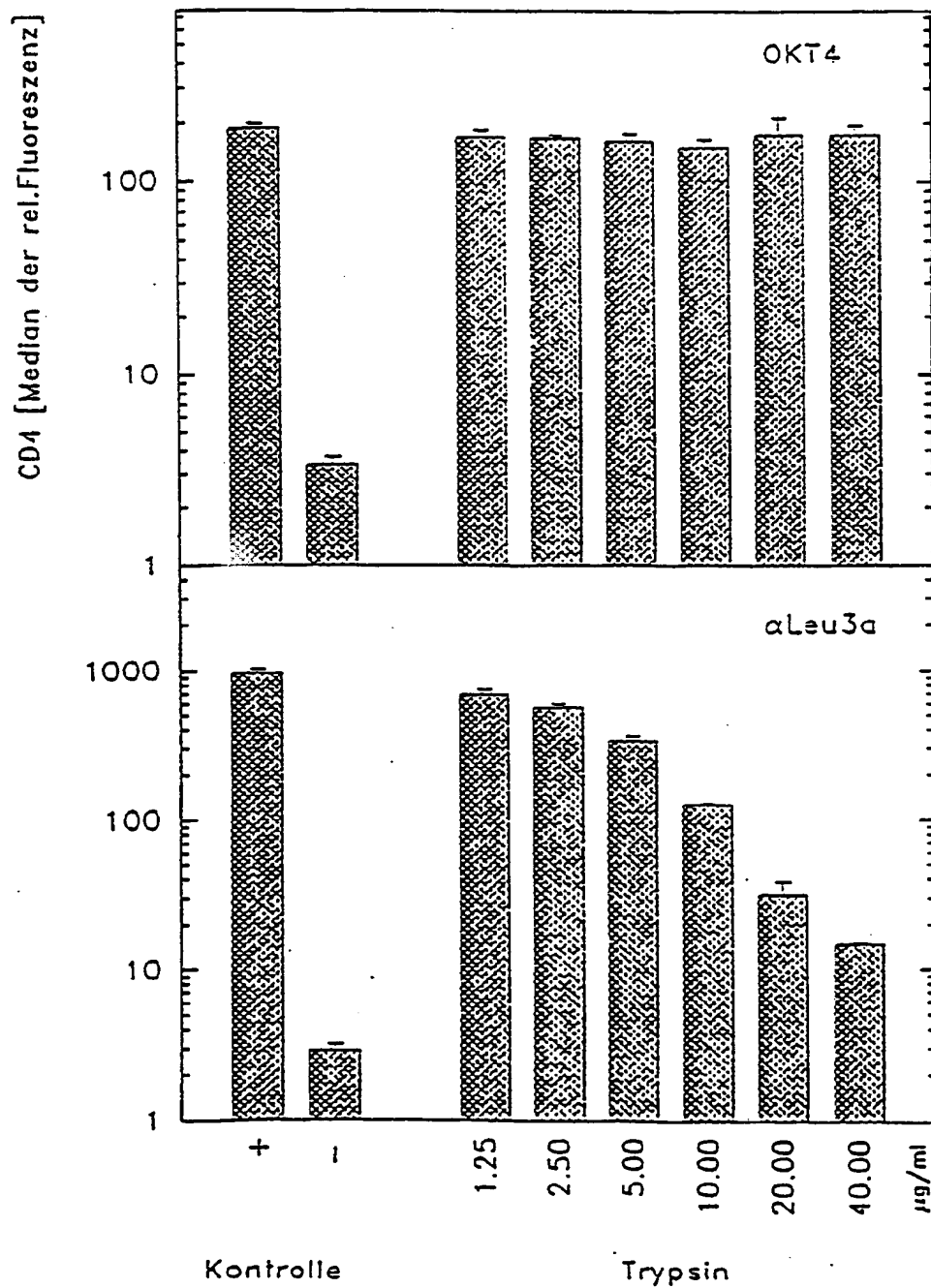


Abbildung 4

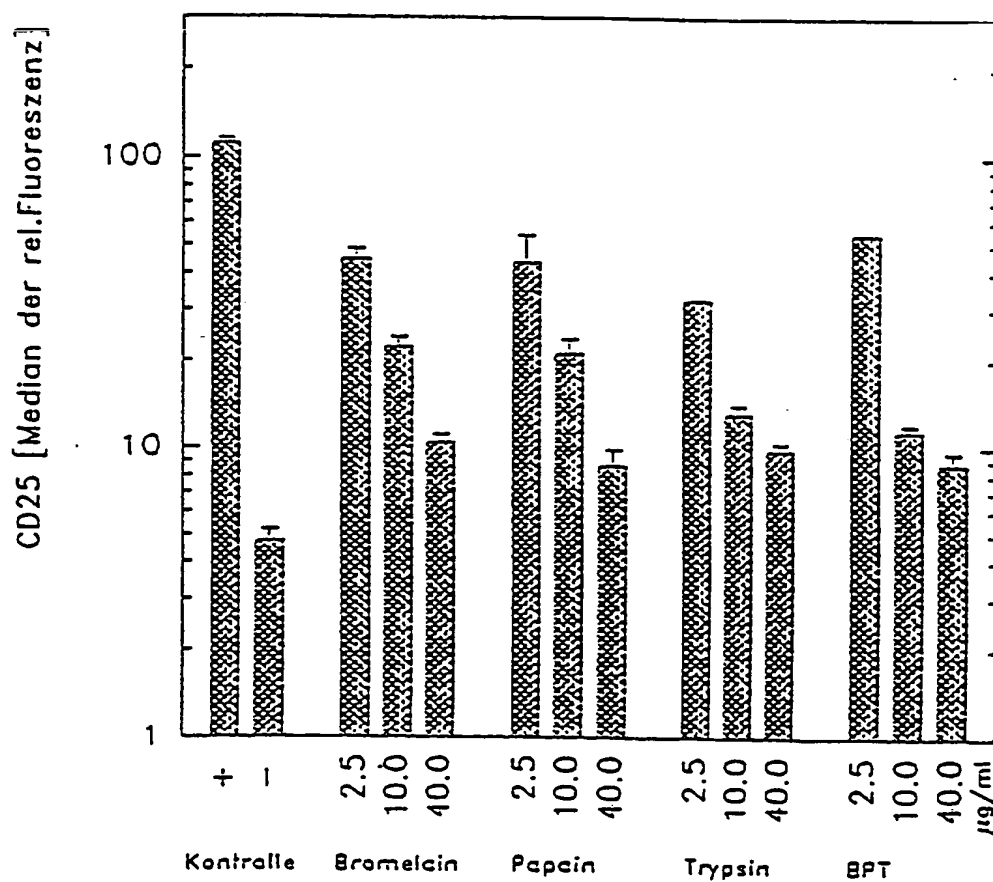


Abbildung 5

